

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 22, 1984, pp. 623–631

## Isolierung und Quantifizierung nicht-sulfatierter und sulfatierter Gallensäuren im Stuhl

Von N. Breuer, P. Dommes, R. Tandon und H. Goebell

Abteilung für Gastroenterologie, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Essen (GHS)

(Eingegangen am 24. November 1983/19. März 1984)

**Zusammenfassung:** Es wird eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von nicht-sulfatierten und sulfatierten Gallensäuren im Stuhl beschrieben. Nach Vorreinigung der Gallensäuren können diese durch Chromatographie an DEAP-Sephadex LH20 in freie, konjugierte und sulfatierte Gallensäuren aufgetrennt werden. In diesen Fraktionen kann dann, gegebenenfalls nach Solvolyse und Hydrolyse, mittels Gaschromatographie eine qualitative und quantitative Analyse der einzelnen Gallensäuren erfolgen. Die Validierung der einzelnen Analysenschritte und die Überprüfung des gesamten Analysenganges durch dem Stuhl zugesetzte Gallensäuren als interne Standards wiesen bei guter Reproduzierbarkeit eine gute Trennung nicht-sulfatierter und sulfatierter Gallensäuren nach. Die Untersuchung von Stuhlproben bei 15 Referenzpersonen ergab eine durchschnittliche Gallensäure-Ausscheidung von 3,85 mg/g Trockenstuhl, wobei 10,4% auf die primären und 89,6% auf die sekundären Gallensäuren entfielen; 92,9% der fäkalen Gallensäuren lagen als freie, 2,7% als konjugierte Gallensäuren vor. Der Anteil der sulfatveresterten Gallensäuren betrug nur 4,4%.

### *Isolation and quantification of non-sulphated and sulphated bile acids in faeces*

**Summary:** A method is described for the qualitative and quantitative analysis of non-sulphated and sulphated bile acids in faeces. After extraction and preliminary purification, the faecal bile acids are separated by liquid-gel-chromatography (DEAP-Sephadex LH20) into free, conjugated and sulphated bile acids; these are quantitated separately (after solvolysis and hydrolysis), and the individual bile acids are analysed by gas-liquid-chromatography. The validation both of the individual analysis steps and the overall procedure by adding bile acid standards to the faecal homogenates showed a good reproducibility and a reliable separation of non-sulphated and sulphated bile acids. Using the described method, the excretion of total faecal bile acids in 15 control subjects was 3.85 mg/g dry stool, consisting of 10.4% primary bile acids and 89.6% secondary bile acids. 92.9% of faecal bile acids were in the free form, only 2.7% in the conjugated form, and 4.4% as sulphated bile acids.

### Einführung

Die in der Leber aus Cholesterin synthetisierten (primären) Gallensäuren Chenodesoxycholsäure und Cholsäure werden fast ausschließlich als Glycin- oder Taurin-Konjugate in den Dünndarm sezerniert, von wo sie zu 95 bis 98% rückresorbiert werden (1).

Durch bakterielle Enzyme werden die Gallensäuren, zum geringen Teil im Ileum, zum größten Teil im Colon, zu freien Gallensäuren dekonjugiert und zu den sekundären Gallensäuren Lithocholsäure und

Desoxycholsäure dehydroxyliert. Diese werden zum Teil ebenfalls rückresorbiert. Die dem enterohepatischen Kreislauf entgehenden Gallensäuren werden zum Teil weiter bakteriell verändert und im Stuhl ausgeschieden.

Mit der hepatischen Sulfatierung, die für viele Substanzen einen allgemeinen Mechanismus der Biotransformation darstellt, wurde 1967 (2) ein zusätzlicher Stoffwechselweg der Gallensäuren beschrieben. Diesem kommt eine besondere Bedeutung bei

Cholestase-Syndromen zu (3–6); hierbei machen die Sulfatester, die neben einer größeren Wasserlöslichkeit auch eine geringere Toxizität für die Leber (7, 8) und den Darm (9) besitzen, den größten Teil der renal ausgeschiedenen Gallensäuren aus (10). Wie in der Niere, werden sulfatierte Gallensäuren auch im Dünndarm weniger gut als nicht-sulfatierte Gallensäuren rückresorbiert (11–13), so daß ihre Ausscheidung in den Faeces ansteigt (12, 14). Angaben darüber, welchen mengenmäßigen Anteil sulfatierte Gallensäuren normalerweise an der fäkalen Gallensäureausscheidung haben, differieren aus methodischen Gründen erheblich (15–18). Der Grad der Desulfatierung durch Bakterien spielt dabei ebenfalls eine Rolle (12).

Wir beschreiben deshalb eine Methode zur Bestimmung der fäkalen Gallensäuren, mit der die sulfatierten Gallensäuren von den nicht-sulfatierten säulenchromatographisch getrennt und separat quantifiziert werden. Darüber hinaus werden die an 15 Referenzpersonen ermittelten Ergebnisse bezüglich des Gallensäuremusters im Stuhl mitgeteilt.

## Materialien und Methoden

### Referenzkollektiv

Bei 15 Patienten unserer Klinik, bei denen sich auf Grund der klinischen Untersuchung und der routinemäßig durchgeführten Laboruntersuchungen kein Anhalt für eine gastrointestinale Erkrankung ergab, bestimmten wir die Gallensäureausscheidung im Stuhl (mg/g Trockenstuhl). Bezüglich der Ernährungsgewohnheiten waren wesentliche Unterschiede nicht offensichtlich. Spezielle Diäten wurden nicht befolgt.

### Reagentien

Alle Reagentien und Lösungsmittel waren, soweit nicht anders angegeben, von E. Merck, Darmstadt. Gallensäurestandards wurden von Sigma, München, Paesel, Frankfurt und PI-Biochemicals, St. Goar, bezogen. [ $^{14}\text{COOH}$ ]-Lithocholsäure (spezif. Aktivität 2,183 TBq/mol  $\pm$  59 m Ci/mmol) von Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig; sämtliche Gallensäuren wiesen dünn-schichtchromatographisch einen Reinheitsgrad >99% auf. XAD-2-Harz und Amberlyst-15-Ionenaustauscher, beide analytical grade, waren von Serva, Heidelberg. DEAP-Sephadex LH20 wurde unter der Bezeichnung Lipidex<sup>TM</sup>-DEAP von Packard Instruments, Frankfurt, bezogen. Sep Pak<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub>-Kartuschen waren von Waters Ass., Königsstein/Ts. Cholyglycin-Hydrolase aus *C. perfringens (welchii)* (100 U/mg Protein) lieferte Sigma, München. Als Szintillator wurde Unisolve I von Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/M., benutzt.

### Geräte

Zur Trocknung der Stuhlproben wurde eine Gefriertrocknungsanlage Lo5 (–60) der Firma WKF, Brandau/Darmstadt, benutzt. Zur gaschromatographischen Analyse diente ein Packard Becker Gaschromatograph Modell 419 von Packard Instruments, Frankfurt. Die Auswertung der Gaschromatogramme erfolgte mit einem SP 4100 Computing Integrator der Firma Spectra Physics, Darmstadt. Zur Messung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität wurde ein Flüssigkeitsszintillationszähler Kontron MR 300 DPM von Kontron Analytik GmbH, Eching/München, benutzt.

## Methoden

### XAD-2-Chromatographie

Amberlite XAD-2 wird in eine Glassäule (innerer Durchmesser 0,6 cm, Länge 30 cm) zu einem Bettvolumen von 8,5 ml gefüllt. Die Säule wird mit Wasser (pH 7,0) äquilibriert.

### Amberlyst-15-Chromatographie

Amberlyst-15 wird in eine Glassäule (innerer Durchmesser 0,6 cm, Länge 30 cm) zu einem Bettvolumen von 8,5 ml gefüllt. Der Ionenaustauscher wird durch Spülen mit HCl (2 mol/l) in 700 ml/l Ethanol in die protonierte Form überführt. Anschließend wird die Säule mit 720 ml/l Ethanol gewaschen.

### DEAP-Sephadex LH20-Chromatographie

DEAP-Sephadex LH20 wird entsprechend der Vorschrift von Alme et al. (19) vorbereitet und hat einen Amingehalt von 1,2 mmol/g Trockensubstanz. Trockenes Gel (0,5 g) wird in 720 ml/l Ethanol (pH 7,0) aufgeschlemmt und in eine Glassäule (innerer Durchmesser 0,5 cm) zu einer Höhe von 11 cm gefüllt (Gelbettvolumen etwa 2,2 ml).

Die Probe, gelöst in insgesamt 4 ml 720 ml/l Ethanol (pH 7,0) wird aufgetragen und mit Druckluft (25 kPa  $\pm$  0,25 atm) in das Gel gedrückt. Die Auftrennung der freien, konjugierten und sulfatierten Gallensäuren in drei entsprechende Fraktionen erfolgt im wesentlichen nach der Methode von Alme et al. (19). Durch Modifikation der Elutionspuffer und -volumina werden jedoch Glycin- und Taurin-konjugierte Gallensäuren in einer Fraktion vereinigt. Das Elutionsschema ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Elutionspuffer werden ebenfalls mit einem Überdruck von 25 kPa  $\pm$  0,25 atm durch das Gel gedrückt, womit eine konstante Flußgeschwindigkeit von 22 ml/h erreicht wird.

Tab. 1. Elutionsschema der DEAP-Sephadex LH20 Säule.

Fraktion	Eluierte Substanzen	Elutionsmittel: 720 ml/l Ethanol		
		Volumen (ml)	Acetat-Konzentration (mol/l)	pH*
1	Neutrale Steroide	10	0,0	7,0
2	Freie Gallensäuren	12	0,10	3,9
3	Konjugierte Gallensäuren	10	0,15	6,6
4	Sulfatierte Gallensäuren	12	0,30	9,6

\* mit konz.  $\text{NH}_3$ -Lösung eingestellt.

## Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse der mit Glycin oder Taurin konjugierten Gallensäuren erfolgt nach der Methode von Roseleur & van Gent (20). Die in 25 mmol/l Natriumacetat gelöste Probe wird mit 200 U Cholyglycin-Hydrolase versetzt. Das Reaktionsgemisch (etwa 6,5 ml) wird 16 h bei 37 °C inkubiert und danach durch eine Sep Pak<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub>-Kartusche gedrückt, die anschließend mit 10 ml Wasser (pH 7,0) gespült wird. Die Gallensäuren werden mit 1,0 ml Methanol eluiert, wobei die ersten 10 Tropfen (bis zum Austritt des Methanols aus der Kartusche) verworfen werden.

## Solvolyse

Die Spaltung der Sulfatester der Gallensäuren wird in Anlehnung an die Methode von *van Berge-Henegouwen* (21) durchgeführt. Die etherische Salzsäurelösung wird durch sorgfältige Destillation einer Mischung von 60 ml Ether und 40 ml konz. Salzsäure über eine *Vigreux*-Kolonnen (30 cm) hergestellt. Die ersten 10 ml des Destillats werden verworfen. Dann werden 30 ml des bei etwa 35 °C übergehenden Destillats gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt. Die Probe, die zunächst in 0,1 ml Methanol gelöst wird, um die Entstehung von Artefakten bei der Solvolyse zu vermeiden, wird mit 1,0 ml etherischer Salzsäure versetzt und 24 h bei Raumtemperatur umgesetzt.

## Gaschromatographie

Die freien Gallensäuren werden, gegebenenfalls nach Hydrolyse und Solvolyse, mit Diazomethan in Ether/Methanol (1 ml, 1:10) verestert und anschließend mit Trifluoressigsäureanhydrid 30 min bei 37 °C zu den entsprechenden Trifluoressigsäureestern umgesetzt. Zur Korrektur der Einspritzvolumina wurde jede Probe vor der Derivatisierung mit 3 $\alpha$ -Hydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -cholansäure (Endkonzentration in der Probe 1 mmol/l) versetzt. Bedingungen: 1% QF1 auf Gaschrom Q (100/120 mesh). Säulenlänge 180 cm, innerer Durchmesser 2 mm. Trägergas: Helium, 45 ml/min. Säulentemperatur 230 °C isotherm; Flammen-Ionisations-Detektor 260 °C, Injection port 250 °C. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt über eine Integration der Peakflächen, wobei mittels einer zuvor erstellten „Multilevel-Calibration-Kurve“ die unterschiedliche Detektorempfindlichkeit für die individuellen Gallensäuren, auch als Funktion ihrer Konzentration, in Rechnung gesetzt wurden.

## Beschreibung des Analysenganges

Der gesamte Analysengang zur Bestimmung fäkaler Gallensäuren ist zur besseren Übersicht in Abbildung 1 dargestellt.

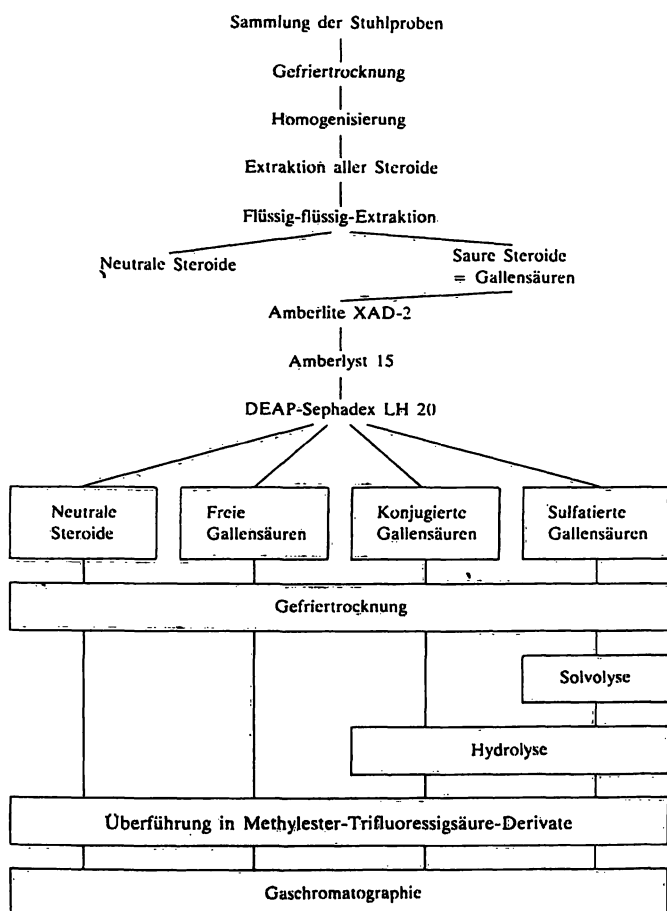


Abb. 1. Flußdiagramm zur Analyse von fäkalen Gallensäuren.

Die *Sammlung der Stuhlproben* erfolgt über 3 Tage, wobei jeder einzelne Stuhl unmittelbar nach Defäkation bei -30 °C eingefroren wird, um einen bakteriellen Abbau der Gallensäuren zu vermeiden. Die anschließende *Gefriertrocknung* erfolgt bis zur Gewichtskonstanz der Probe. Nach der mechanischen *Homogenisierung* des gefriergetrockneten Materials werden alle Trockenstühle entsprechend ihren Trockengewichten vereinigt. Hiervon wird 1 g zur *Extraktion* mit 100 ml 900 ml/l Ethanol am Rückfluß (2 h) verwendet. Nach Zentrifugation (15 min, 15000 g) wird das Sediment in 100 ml 800 ml/l Ethanol aufgenommen und weitere 2 h extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Sediment abschließend mit 100 ml Chloroform/Methanol (Volumina, 1 + 1) am Rückfluß extrahiert. Der bei der anschließenden Zentrifugation anfallende Überstand wird mit den Überständen der vorausgegangenen Zentrifugationen vereinigt und zur Trockne eingengt.

Zur *Flüssig-Flüssig-Extraktion* wird der Rückstand in 100 ml 720 ml/l Ethanol aufgenommen und mit 1 ml konz. Ammoniaklösung alkalisch gemacht (pH 11). Die Lösung wird zur Extraktion der neutralen Steroide dreimal mit je 100 ml *n*-Hexan ausgeschüttelt. 1/10 der ethanolischen Phase wird zur Trockne eingengt (der Rest wird für weitere Bestimmungen eingefroren). Der Rückstand wird mit insgesamt 10 ml 88 mmol/l Ammoniumcarbonatlösung aufgenommen und auf das *XAD-2*-Harz gegeben. Die Säule wird mit 100 ml Wasser (pH 7,0) gespült. Die an das Harz adsorbierten Gallensäuren werden mit 50 ml 720 ml/l Ethanol (pH 7,0) eluiert. Dieses Eluat wird direkt auf die *Amberlyst-15-Ionenaustauschersäule* gegeben; das Harz wird anschließend mit 50 ml 720 ml/l Ethanol (pH 7,0) gewaschen. Durchlauf und Eluat der Säule (insgesamt 100 ml) werden zur Trockne abgezogen. Der Rückstand wird mit insgesamt 4 ml 720 ml/l Ethanol (pH 7,0) aufgenommen und auf das *DEAP-Sephadex LH20*-Gel gegeben. Die Säule wird dann, wie oben angegeben, eluiert; die 4 Fraktionen werden zur Entfernung des Ammoniumacetats lyophilisiert. Fraktion 4 (mit sulfatierten Gallensäuren) wird zunächst solvolysiert, dann wie Fraktion 3 (mit konjugierten Gallensäuren) hydrolysiert. Nach Vorliegen der freien Gallensäuren können diese Fraktionen zusammen mit Fraktion 1 (mit neutralen Steroiden) und Fraktion 2 (mit freien Gallensäuren) nach Zugabe des internen Standards (3 $\alpha$ -Hydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -cholansäure, 1 mmol/l), wie im Abschnitt Gaschromatographie beschrieben, in die Methylster-trifluoressigsäurederivate überführt und gaschromatographisch analysiert werden.

## Ergebnisse

Dargestellt werden die Ergebnisse der Überprüfung der einzelnen Analysenschritte und der des gesamten Analysenganges von Stuhlproben unter Zugabe von Standardlösungen. Anschließend werden Daten hinsichtlich des Gallensäuren-musters nicht-sulfatierter und sulfatierter Gallensäuren im Stuhl beim Menschen mitgeteilt.

## Überprüfung der einzelnen Analysenschritte

Zur methodischen Validierung wurden Standardlösungen unterschiedlicher Gallensäuren (1 mmol/l) verwendet, wobei jeweils 1 ml der entsprechenden Gallensäure in den Versuch eingesetzt wurde.

### Hydrolyse (Tab. 2)

Bei der Hydrolyse Glycin- und Taurin-konjugierter Gallensäuren treten fast keinerlei Verluste auf, so daß die enzymatische Spaltung als komplett anzusehen ist.

### Solvolyse

Die Ausbeute der Solvolyse, geprüft mit 3 $\alpha$ -Sulfolithocholsäure, betrug  $79,0 \pm 0,9\%$  (Mittelwert und dessen Standardabweichung aus 6 Versuchen).

Tab. 2. Wiederfindung bei der Hydrolyse von mit Glycin und Taurin konjugierten Gallensäuren.

Eingesetzte Gallensäuren <sup>1)</sup>	Wiederfindung (%) <sup>2)</sup> $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
Glycolithocholsäure	$99,0 \pm 1,4$
Glycodesoxycholsäure	$99,0 \pm 1,4$
Taurochenodesoxycholsäure	$92,5 \pm 1,1$
Taurocholsäure	$97,2 \pm 4,1$

<sup>1)</sup> Eingesetzt wurde jeweils 1  $\mu$ mol der angegebenen Gallensäuren.

<sup>2)</sup> Pro Gallensäure wurden 5 Versuche durchgeführt; angegeben sind der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und dessen Standardabweichung ( $s_{\bar{x}}$ ).

Tab. 3. Wiederfindung von Gallensäuren bei der XAD-2- und Amberlyst-15-Chromatographie.

Aufgetragene Gallensäuren <sup>1)</sup>	XAD 2 <sup>2)</sup> Wiederfindung (%) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Amberlyst 15 <sup>2)</sup> Wiederfindung (%) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
<i>Freie Gallensäuren</i>		
Lithocholsäure	$100,0 \pm 5,0$	$93,3 \pm 5,0$
Desoxycholsäure	$110,0 \pm 4,5$	$106,8 \pm 6,5$
Chenodesoxycholsäure	$95,0 \pm 3,1$	$97,6 \pm 3,1$
Ursodesoxycholsäure	$92,0 \pm 4,5$	$107,4 \pm 4,5$
Cholsäure	$98,0 \pm 3,6$	$84,9 \pm 3,6$
<i>Konjugierte Gallensäuren</i>		
Glycodesoxycholsäure	$93,1 \pm 3,1$	$92,6 \pm 2,0$
Taurocholsäure	$89,5 \pm 1,6$	$89,4 \pm 1,3$
<i>Sulfatierte Gallensäuren</i>		
3 $\alpha$ -Sulfolithocholsäure	$91,2 \pm 1,1$	$91,0 \pm 1,8$

<sup>1)</sup> Aufgetragen wurde jeweils 1  $\mu$ mol der angegebenen Gallensäuren.

<sup>2)</sup> Pro Gallensäure wurden 6 Versuche durchgeführt. Verluste durch gegebenenfalls erforderliche Hydrolyse und Solvolyse sind miteingeschlossen. Angegeben sind der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und dessen Standardabweichung ( $s_{\bar{x}}$ ).

### XAD-2- und Amberlyst-15-Chromatographie (Tab. 3)

Zur Überprüfung der Wiederfindung wurden unterschiedliche freie, konjugierte und sulfatierte Gallensäuren auf die Säulen aufgebracht. Die Verluste, die durch die vor der gaschromatographischen Analyse erforderlichen Hydrolyse- und Solvolyseschnitte verursacht werden, sind in den aufgeführten Ergebnissen mitenthalten.

### DEAP-Sephadex LH20-Chromatographie (Abb. 2)

In diesen Versuchen wurde neben der Wiederfindungsrate für die einzelnen Gallensäuren auch die Trennleistung der Säule überprüft. Deshalb wurden in den Versuchen mit konjugierten Gallensäuren alle Fraktionen der Hydrolyse und bei der Untersuchung der sulfatierten Gallensäuren alle Fraktionen der Solvolyse unterworfen.

### Gaschromatographie

Zur Kontrolle des Meßbereichs der Gaschromatographie wurden 5 Gallensäuren in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Als interner Standard wurde 3 $\alpha$ -Hydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -cholansäure (1 mmol/l) zugesetzt. Die Standardgerade der einzelnen Gallensäuren wurde über ein „multilevel-Calibration“-Verfahren für eine nichtlineare Responsekurve erstellt. Bei einer Konzentration von 0,025 mmol/l liegt die relative Standardabweichung bei etwa 5% und sinkt mit steigender Konzentration (ab 0,5 mmol/l) auf etwa 2%. Die Abweichungen vom Sollwert liegen bei einer Konzentration von 0,025 mmol/l bei etwa 25%, betragen jedoch schon ab 0,05 mmol/l nur noch etwa 5%. Auf Grund unserer Ergebnisse setzten wir als untere Nachweisgrenze mit ausreichender Präzision eine Konzentration von 0,035 mmol/l fest. Bei mehreren Stuhlanalysen fanden sich häufiger zwei quantitativ bedeutendere Peaks, die wir anhand der in der Literatur (22) angegebenen Daten als 12 $\beta$ -Hydroxy- und 3 $\alpha$ , 12 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\alpha$ -cholansäuren identifizierten.

### Überprüfung des gesamten Analysenganges fäkalen Gallensäuren (Tab. 4)

Da bei der Natur des Untersuchungsmaterials nicht damit gerechnet werden konnte, daß bei der Analyse fäkalen Gallensäuren die gleichen Wiederfindungsraten erreicht würden wie bei den Versuchen mit Standardsubstanzen allein, wurden Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit anhand von Stuhlpro-

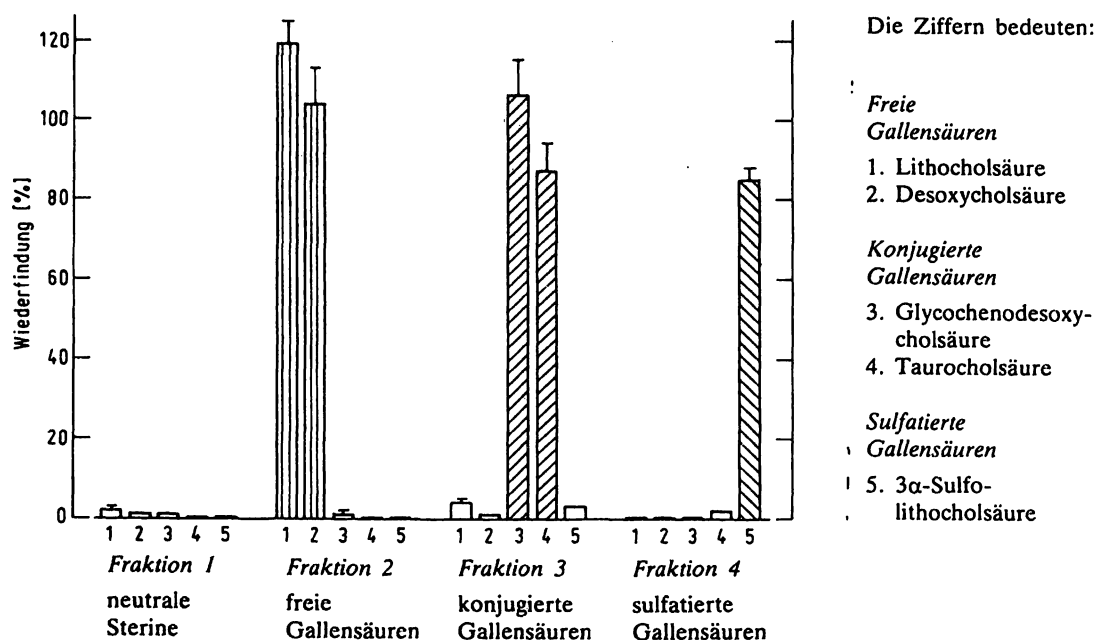


Abb. 2. Trennung und Wiederfindung von Gallensäuren bei der DEAP-Sephadex LH 20-Chromatographie (6 Versuche pro Gallensäure. Angegeben sind Mittelwert und dessen Standardabweichung. Verluste durch Hydrolyse und Solvolyse sind eingeschlossen.)

Tab. 4. Wiederfindung der den Stuhlproben zugesetzten Gallensäuren.

Eingesetzte Gallensäuren	Eingesetzte <sup>1)</sup> Menge	Wiederfindung (%) <sup>2)</sup> $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
<b>Freie Gallensäuren</b>		
<sup>14</sup> C-Lithocholsäure	4987 counts/min	82,8 ± 4,3
<b>Konjugierte Gallensäuren<sup>3)</sup></b>		
Taurocholsäure o. Glycodesoxycholsäure	1 µmol	93,4 ± 4,1
<b>Sulfatierte Gallensäuren</b>		
3α-Sulfolithocholsäure	1 µmol	74,6 ± 1,6

<sup>1)</sup> Die Gallensäuren wurden zu 1 g Trockenstuhl zugesetzt. Pro Gallensäure wurden 6 Versuche durchgeführt.

<sup>2)</sup> Angegeben sind Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und dessen Standardabweichung ( $s_{\bar{x}}$ ).

<sup>3)</sup> In 3 Versuchen wurde Taurocholsäure, in 3 Versuchen Glycodesoxycholsäure zugesetzt.

ben zusätzlich bestimmt. Dazu wurde bei 6 Patienten nach erfolgter Analyse fäkalen Gallensäuren einem weiteren Aliquot der gefriergetrockneten Stühle vor der Extraktion eine definierte Menge von Gallensäuren (1 ml, 1 mmol/l) zugesetzt, die auf Grund der

vorhergehenden Analyse nicht in der Stuhlprobe vorhanden waren, und auf ihre Wiederfindung hin geprüft. Lediglich für Lithocholsäure ließ sich naturgemäß keine Stuhlprobe finden, die frei von dieser Gallensäure war, weshalb wir <sup>14</sup>C-markierte Lithocholsäure für die Wiederfindungsuntersuchungen benutzten. Aus den Wiederfindungsraten der zugesetzten Gallensäuren wurde für jede Fraktion (frei, konjugierte, sulfatierte Gallensäuren) ein Faktor errechnet, mit dem die bei späteren Analysen auftretenden, für die einzelnen Fraktionen unterschiedlichen Verluste korrigiert wurden.

#### Ausscheidungsmuster nicht-sulfatierter und sulfatierter Gallensäuren im Stuhl von Referenzpersonen

Die unter Anwendung der beschriebenen Methode erzielten Ergebnisse sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt. Den größten Anteil (89,6%) der fäkalen Gallensäuren stellen die sekundären Gallensäuren dar; weiterhin sind fast alle Gallensäuren (92,9%) im Stuhl nicht mehr glyc- oder taurinkonjugiert. Die sulfatierten Gallensäuren stellen mit 4,4% nur einen kleinen Anteil an der Gesamtausscheidung dar. Ein signifikanter Unterschied im Sulfatierungsgrad der einzelnen Gallensäuren liegt nicht vor.

## Diskussion

### Methodik

Der wesentliche Vorteil der von uns beschriebenen Methode liegt in der voneinander unabhängigen Bestimmung der nicht-sulfatierten und sulfatierten Gallensäuren, die durch die säulenchromatographische Trennung auf DEAP-Sephadex LH20 ermög-

licht wird. Demgegenüber besteht eine größere Fehlermöglichkeit, wenn man den Anteil der Sulfatester indirekt bestimmt, indem man die Differenz von zwei Analysen (mit und ohne Solvolyseschritt) bildet.

Durch das sofortige Einfrieren der gesammelten Stuhlproben wird ein bakterieller Abbau der Gallensäuren verhindert. Die mechanische *Homogenisierung* des Lyophilisates gewährleistet eine Homogenität der Untersuchungsprobe.

Bei der *Extraktion* der Gallensäuren aus dem Stuhl ist zu berücksichtigen, daß ein beträchtlicher Teil der Gallensäuren an feste Stuhlbestandteile wie Bakterien (23) und Faserstoffe, wie Lignin (24), gebunden ist. Die drei von uns verwendeten Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität (25) führten nicht nur auch in unserer Hand zu guten Wiederfindungsraten der dem Stuhl (exogen) zugesetzten Gallensäuren, sondern auch zu guten Extraktionsergebnissen von endogenen, d. h. dem Patienten verabreichten (radioaktiv markierten) und somit schon im Stuhl vorhandenen Gallensäuren (25). Die *XAD-2-Chromatographie* wird zur Abtrennung von Verunreinigungen angewendet, insbesondere von Salzen, die die anschließende Chromatographie an *Amberlyst-15* stören würden. Dieser Kationenaustauscher dient zur Überführung der Gallensäuren in ihre protonierte Form als Voraussetzung für die sich daran anschließende Chromatographie an *DEAP-Sephadex LH20*. Hierbei handelt es sich um ein lipophiles Gel zur Auftrennung von in organischen Lösungsmitteln gelösten Gallensäuren, die hauptsächlich nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt werden. Da der Anteil der konjugierten Gallensäuren an der Gesamtausscheidung der fäkalen Gallensäuren mit weniger als 3% recht klein ist, ermöglicht die von uns geübte gemeinsame Elution der

Tab. 5. Ausscheidungsmuster fäkalen Gallensäuren bei Referenzpersonen (n = 15).

	Konzentration <sup>1)</sup> (mg/g Trok- kenstuhl)	Anteil (%) an <sup>2)</sup> Gesamt- ausschei- dung
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
Gesamtgallensäuren	3,85 ± 0,63	100,0
<i>Primäre Gallensäuren</i>	0,36 ± 0,13	10,4 ± 2,6
Chenodesoxycholsäure	0,19 ± 0,06	6,1 ± 1,4
Cholsäure	0,17 ± 0,07	4,3 ± 1,3
<i>Sekundäre Gallensäuren</i>	3,49 ± 0,61	89,6 ± 2,6
Lithocholsäure	1,54 ± 0,41	43,6 ± 3,8
Desoxycholsäure	1,62 ± 0,37	37,6 ± 3,3
Ursodesoxycholsäure	0,16 ± 0,10	4,2 ± 2,0
3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\alpha$ -cholansäure	0,12 ± 0,04	2,5 ± 0,8
12 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -cholansäure	0,06 ± 0,01	1,7 ± 0,4
<i>Nicht-sulfatierte Gallensäuren</i>	3,67 ± 0,59	95,6 ± 1,2
frei	3,58 ± 0,58	92,9 ± 1,9
konjugiert	0,10 ± 0,03	2,7 ± 0,7
<i>Sulfatierte Gallensäuren</i>	0,18 ± 0,06	4,4 ± 1,2

<sup>1)</sup> Zur Berechnung wurde jeweils das Molekulargewicht der entsprechenden freien Gallensäure eingesetzt.

<sup>2)</sup> Die Berechnung des Anteils erfolgte über die molare Konzentration der einzelnen Gallensäuren.

Tab. 6. Verteilung der einzelnen Gallensäuren auf die Fraktion der freien, konjugierten und sulfatierten Gallensäuren bei Referenzpersonen (n = 15) (angegeben in Prozent der Gesamtausscheidung, molaritätsbezogen).

	Gallensäurefraktion			Anteil der Gallensäuren
	frei	konjugiert	sulfatiert	
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
Chenodesoxycholsäure	4,8 ± 1,1	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,3	6,1 ± 1,4
Cholsäure	3,4 ± 1,2	0,8 ± 0,3	0,1 ± 0,1	4,3 ± 1,3
Lithocholsäure	41,2 ± 3,8	0,2 ± 0,1	2,2 ± 0,5	43,6 ± 3,8
Desoxycholsäure	35,7 ± 3,1	0,5 ± 0,2	1,4 ± 0,5	37,6 ± 3,3
Ursodesoxycholsäure	4,0 ± 1,9	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	4,2 ± 2,0
3 $\alpha$ ,12 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\alpha$ -cholansäure	2,2 ± 0,8	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	2,5 ± 0,8
12 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -cholansäure	1,6 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,4
Anteil der Fraktion $\bar{x} \pm s_x$	92,9 ± 1,9	2,7 ± 0,7	4,4 ± 1,2	100,0

Glycin- und Taurin-Konjugate eine genauere Quantifizierung. Wie unsere Ergebnisse belegen, zeigten sich XAD-2- und Amberlyst-15-Chromatographie durch eine gute Reproduzierbarkeit und geringe Verluste aus. Bei der Überprüfung der Trenneigenschaften von DEAP-Sephadex LH20 war der Übertritt der konjugierten Gallensäuren in die Sulfatesterfraktion mit 2,5% äußerst gering, so daß fälschlich hohe Werte für die sulfatierten Gallensäuren wegen des geringen Anteils der Gallensäurenkonjugate an der Gesamtausscheidung praktisch auszuschließen sind. Da auch kein wesentlicher Übertritt der sulfatierten Gallensäuren in die vorausgehenden Fraktionen nachzuweisen war, ist der Fehler einer falsch niedrigen Messung der Sulfatesterfraktion als gering anzusehen. Um eine gute Trennung zu erzielen, sollte unseren Erfahrungen zufolge die Durchflußgeschwindigkeit nicht kleiner als 20 bis 22 ml/Stunde betragen.

Auf Grund des gewählten Extraktionsverfahrens mit Sep Pak<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub> Kartuschen war die Durchführung der enzymatischen *Hydrolyse* fast verlustfrei.

Das von uns gewählte *Solvolyseverfahren* mit etherischer Salzsäure ermöglicht eine sofortige Weiterverarbeitung der Probe nach Abblasen des Solvolysemittels; eine Extraktion der freigesetzten Gallensäuren ist somit nicht erforderlich.

Zur *gaschromatographischen Analyse* wurden verschiedene Derivate (Methylester, Methylester-trimethylsilylether, Methylester-heptafluorobutyrate, Methylester-acetat) und Säulenmaterialien (Poly S 176 und SP 2250) getestet, die optimale Trennung erzielten wir jedoch mit Methylester-trifluoroacetat-Derivaten auf einer 1% QF1 Säule.

#### Gallensäureausscheidung bei Referenzpersonen

Für die Gesamtmenge der im Stuhl ausgeschiedenen Gallensäuren werden sehr unterschiedliche Angaben gemacht. Obgleich Menge und Zusammensetzung der Gallensäureausscheidung sicherlich auch individuellen Schwankungen infolge ernährungs- und stoffwechselbedingter Faktoren unterworfen sein dürfte, ist die Unterschiedlichkeit der Angaben auch auf die Anwendung verschiedener Bestimmungsverfahren zurückzuführen. Hierauf weist eine vergleichende Gegenüberstellung der Daten (26) hin. Diese Unterschiede betreffen sowohl die Angaben der Gesamtausscheidung pro Zeiteinheit als auch die Gallensäuremenge pro Gewichtseinheit Stuhl. Während Untersuchungen an amerikanischen Referenzpersonen eine Ausscheidung von 10,0 mg/g

Trockenstuhl ergaben (27), wurde an einem englischen Untersuchungsgut ein mittlerer Wert von 4,7 mg/g (28) ermittelt, vergleichbar mit unseren Ergebnissen. Der Eindruck, daß die durch chemische Analysen des Stuhls ermittelten Werte für die Gallensäureausscheidung generell niedriger liegen als die durch Isotopenmethoden (29) erzielten Ergebnisse, wurde durch die simultane Anwendung beider Verfahren bestätigt (15). Durch Einführung eines Solvolyse-Schrittes (30) in eine etablierte chemische Bestimmungsmethode (26) wurden jedoch höhere Ausscheidungswerte ermittelt, die den durch Isotopentechniken erzielten Ergebnissen entsprachen. Vernachlässigte man den durch Differenzbildung ermittelten Anteil der sulfatierten Gallensäuren, der etwa 1/3 der Gesamtausscheidung ausmachte, so waren die Ergebnisse vergleichbar mit den Ergebnissen anderer chemischer Analyseverfahren. Demgegenüber konnten andere Autoren durch eine zusätzliche Solvolyse, also ohne eine chromatographische Abtrennung durchzuführen, nur Spuren (15) bzw. keine signifikanten Mengen (18) nachweisen.

Eine chromatographische Abtrennung der sulfatierten Gallensäuren von den nicht-sulfatierten mittels Sephadex-LH20 ergab einen Anteil der Sulfatester von etwa 12% (17), während mit gleicher Technik andernorts (31) keine sulfatierten Gallensäuren im Stuhl nachgewiesen werden konnten. Da der Gebrauch dieses Gels neben anderen Trennproblemen insbesondere leicht eine Kontamination der Sulfatesterfraktion durch die (in Stuhlproben) in größerer Menge vorhandenen nicht-sulfatierten Gallensäuren erfolgen kann (32), wählten wir zur genaueren Analyse die DEAP-Sephadex LH20-Säule, die eine bessere Trennleistung aufweist (19). Mit dieser Methode bestimmten wir den Anteil der sulfatierten Gallensäuren im Stuhl mit 4,4%, wobei aufgrund unserer Ergebnisse kein Unterschied im Sulfatierungsgrad der einzelnen Gallensäuren vorzuliegen scheint. Erwähnenswert erscheint uns, daß kürzlich, ebenfalls unter Verwendung des DEAP-Sephadex LH20 Gels, der Anteil der sulfatierten Gallensäuren an der Gallensäure-Ausscheidung aus dem Ileum (über ein Ileostoma) mit 1,5% ermittelt wurde (33).

Die weitere Analyse des Gallensäureausscheidungsmusters entsprach den bekannten Angaben in der Literatur. Erwartungsgemäß (18, 34) waren Glycin- und Taurin-Konjugate praktisch vollständig (92,9%) durch die Einwirkung der Dickdarmbakterien gespalten worden.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (18, 27, 28, 35, 36) lag nur ein geringer Anteil als primäre Gallensäuren Chenodesoxychol-

säure und Cholsäure vor; der überwiegende Teil (89,6%) war durch bakterielle Dehydroxylierung in sekundäre Gallensäuren überführt worden.

### Klinische Bedeutung

Mehrere Untersuchungen haben eine Abhängigkeit der biologischen Wirkung der Gallensäuren von ihrer Struktur gezeigt, was in mehrerer Hinsicht auch für die unterschiedlichen Eigenschaften nicht-sulfatierter und sulfatierter Gallensäuren gilt. So wird zum Beispiel die stark hepatotoxische Monohydroxygallensäure Lithocholsäure (37) bei Cholestase vermehrt sulfatiert (3–6), was zu einer vermehrten Ausscheidung über Niere und Darm führt. Darüber hinaus weist der Lithocholsäuresulfatester aber auch eine deutlich geringere Toxizität auf (7, 38). Über diesen Mechanismus wird auch im Rahmen der medikamentösen Gallensteinauflösung mit Chenodesoxycholsäure die vermehrt anfallende Lithocholsäure metabolisiert (39). Bei Tieren mit geringer Kapazität zur Sulfatierung kommt es hingegen zu einer Akkumulation von Lithocholsäure, die morphologische und funktionelle Veränderungen der Leber bewirkt (8). Neuere Untersuchungen (40, 41) zeigen jedoch, daß die Sulfatierung nicht generell die Entstehung einer intrahepatischen Cholestase verhindern kann. Ein weiteres Beispiel für die Struktur-Wirkungs-Beziehung bei Gallensäuren ist die Hemmung des Wasser- und Elektrolyttransports im Colon (42), die sich nur für Dihydroxygallensäuren nachweisen läßt, die ihre Hydroxylgruppen in  $\alpha$ -Position am Steroidgerüst tragen (43, 44). Dieser sekretorische Effekt, der sich klinisch bei Erkrankungen oder Resektionen des terminalen Ileums infolge einer Gallensäurenmalabsorption zeigt (45), wird jedoch eigenen Untersuchungen zufolge (9) bei sulfatierten Dihydroxygallensäuren nicht gefunden. Schließlich sprechen auch einige Untersuchungen, die sich mit der Co-Carcinogenität von Gallensäuren (46, 47) bei der Entstehung des Coloncarcinoms be-

fassen, für eine unterschiedliche Wirkung verschiedenen strukturierter Gallensäuren. Für eine besondere Rolle der sekundären Gallensäuren hierbei sprechen nicht nur tierexperimentelle Untersuchungen (48), sondern auch die Beobachtung, daß sich nur die sekundären Gallensäuren, nicht aber die primären, im AMES-Test als co-mutagen erwiesen (49). Darüber hinaus konnte nur mit nicht-sulfatierter Lithocholsäure eine Transformierung von Embryozellen des Syrischen Hamsters ausgelöst werden, nicht jedoch mit dem entsprechenden Sulfatester (50). Ob die Sulfatierung sekundärer Gallensäuren deren co-mutagene Wirkung aufhebt, wird zur Zeit von uns untersucht.

Die aufgeführten Beispiele belegen eine geringere Toxizität der sulfatierten Gallensäuren, deren Anteil an der Gesamtausscheidung durch die hepatische Sulfatierung (14, 51, 52) einerseits und die bakterielle Desulfatierung im Darm (12) andererseits bestimmt wird. Augenblicklich gibt es noch keinen Weg, die Aktivität der hepatischen Sulfotransferase (53, 54), deren Aktivität jedoch individuelle Unterschiede aufweist (55), zu beeinflussen. In der nahen Zukunft jedoch erscheint es uns geboten, mittels der fäkalen Gallensäureanalyse sowohl die Rolle der sulfatierten Gallensäuren bei Erkrankungen des Colons, insbesondere beim Coloncarcinom, als auch die mögliche Beeinflussung des Sulfatierungsgrades durch Veränderungen der bakteriellen Mikroflora im Dickdarm zu erforschen. Untersuchungen in diese Richtung sind von uns begonnen worden.

### Danksagung

Das Projekt wurde seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 102, Projekt D2) gefördert.

R. Tandon war Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung; jetzige Adresse: All India Institute of Medical Sciences, Dept. of Gastroenterology, New Delhi, India.

Den technischen Assistentinnen A. Scheel und C. Wirth danken wir für ihre zuverlässige und sorgfältige Mitarbeit.

### Literatur

- Small, D. M., Dowling, R. H. & Redinger, R. N. (1972) *Arch. Intern. Med.* 130, 552–573.
- Palmer, R. H. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1047–1050.
- Stiehl, A. (1972) In: *Bile Acids in Human Diseases* (Back, P. & Gerok, W., Hrsg.), pp. 73–77, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart–New York.
- Back, R. (1973) *Clin. Chim. Acta* 4, 199–207.
- Makino, I., Hashimoto, H., Shinozaki, K., Yoshino, K. & Nakagawa, S. (1975) *Gastroenterology* 68, 545–553.
- van Berge Henegouwen, G. P., Brandt, K.-H., Eysen, H. & Parmentier, G. (1976) *Gut* 17, 861–869.
- Czygan, P. & Stiehl, A. (1975) *Z. Gastroenterol.* 13, 468–473.
- Gadacz, T. R., Allan, R. N., Mark, E. & Hofmann, A. F. (1976) *Gastroenterology* 70, 1125–1129.
- Breuer, N. F., Rampton, D. S., Tammar, A., Murphy, G. M. & Dowling, R. H. (1983) *Gastroenterology* 84, 969–977.
- Stiehl, A., Thaler, M. M. & Admirand, W. H. (1972) *N. Engl. J. Med.* 286, 858–861.
- Low Beer, T. S., Tyor, M. P. & Lack, L. (1969) *Gastroenterology* 56, 721–726.
- Cowen, A. E., Kormann, M. G., Hopfmann, A. F., Cass, O. W. & Coffin, S. B. (1975) *Gastroenterology* 69, 67–76.



13. De Witt, E. H. & Lack, L. (1980) *Amer. J. Physiol.* 238, G34–39.
14. Palmer, R. H. (1971) *J. Lipid Res.* 12, 680–687.
15. Subbiah, M. T. R., Tyler, N. E., Buscaglia, M. D. & Marai, L. (1976) *J. Lipid Res.* 17, 78–84.
16. Podesta, M. T., Murphy, G. M., Sladen, G. E. & Dowling, R. H. (1978) *Clin. Sci. Mol. Med.* 54, 32 p.
17. Salvio, G. & Salati, R. (1979) *Gut* 20, 698–704.
18. Mc Junkin, B., Fromm, H., Sarva, R. P. & Amin, P. (1981) *Gastroenterology* 30, 1454–1464.
19. Alme, B., Bremmelgaard, A., Sjövall, J. & Thomassen, P. (1977) *J. Lipid Res.* 18, 339–362.
20. Roseleur, O. J. & van Gent, C. M. (1976) *Clin. Chim. Acta* 66, 269–272.
21. van Berge-Henegouwen, G. P., Allan, R. N., Hofmann, A. F. & Yu, P. Y. S. (1977) *J. Lipid Res.* 18, 118–122.
22. Sjövall, J. (1962) *Acta Chem. Scand.* 16, 1761–1764.
23. Gustafsson, B. E. & Norman, A. (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110, 387–389.
24. Eastwood, M. A. & Hamilton, D. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 152, 165–173.
25. Setchell, K. D. R., Lawson, A. M., Sjövall, J. & Tanida, N. (1980) VI. International Bile Acid Meeting, Bile Acids and Lipids, Freiburg/Br., Abstract book p. 71.
26. Grundy, S. M., Ahrens, E. H. & Miettinen, T. A. (1965) *J. Lipid Res.* 6, 397–410.
27. Reddy, B. S. & Wynder, E. L. (1977) *Cancer* 39, 2533–2539.
28. Hill, M. J., Drasar, B. S., Williams, R. E. O., Meader, T. W., Cox, A. G., Simpson, J. E. P. & Morson, B. C. (1975) *Lancet* i, 535–539.
29. Lindstedt, S. (1957) *Acta Physiol. Scand.* 40, 1–9.
30. Podesta, M. T., Murphy, G. M. & Dowling, R. H. (1980) *J. Chromatogr.* 182, 293–300.
31. Islam, M. A., Raicht, R. F. & Cohen, B. I. (1981) *Anal. Biochem.* 112, 371–377.
32. Eyssen, H. J., Parmentier, G. G. & Mertens, J. A. (1976) *Eur. J. Biochem.* 66, 507–514.
33. Raedsch, R., Stiehl, A., Walker, S., Czygan, P. & Kommerell, B. (1983) *Z. Gastroenterol.* 21, 426.
34. Danielsson, H. (1963) In: *Advances in Lipid Research* (Paoletti, R. & Kritchevsky, D., Hrsg.), Bd. 1, 335–385, Academic Press, New York–London.
35. Hofmann, A. F. (1972) *Arch. Intern. Med.* 130, 597–604.
36. Aldini, R., Roda, A., Festi, D., Sama, C., Mazella, G., Bazzoli, F., Morselli, A. M., Roda, E. & Barbara, L. (1982) *Dig. Dis. Sci.* 27, 495–502.
37. Palmer, R. H. (1972) *Arch. Intern. Med.* 130, 606–617.
38. Leuschner, U., Czygan, P. & Stiehl, A. (1975) *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 81, 1311–1313.
39. Allan, R. N., Thistle, J. L., Hofmann, A. F., Carter, J. A. & Yu, P. Y. S. (1976) *Gut* 17, 405–412.
40. Yousef, I. M., Tuchweber, B., Vonk, R. J., Masse, D., Audet, M. & Roy, C. C. (1981) *Gastroenterology* 80, 233–241.
41. Mathis, U., Karlaganis, G. & Preisig, R. (1983) *Gastroenterology* 85, 674–681.
42. Mekhjian, H. S., Phillips, S. F. & Hofmann, A. F. (1971) *J. Clin. Invest.* 50, 1569–1577.
43. Chadwick, V. S., Gaginella, T. S., Carlson, G. L., Debongnie, J. C., Phillips, S. F. & Hofmann, A. F. (1979) *J. Lab. Clin. Med.* 94, 661–674.
44. Gordon, S. J., Kinsey, M. D., Magen, J. S., Joseph, R. E. & Kowlessar, O. D. (1979) *Gastroenterology* 77, 38–44.
45. Hofmann, A. (1967) *Gastroenterology* 52, 752–757.
46. Hill, M. J. (1976) In: *The Bile Acids* (Nair, P. P. & Kritchevsky, D., Hrsg.), Bd. 3 (Metabolism), 169–200, Plenum Press, New York.
47. Nigro, N. D. & Campbell, R. L. (1976) In: *The Bile Acids* (Nair, P. P. & Kritchevsky, D., Hrsg.), Bd. 3 (Metabolism), 155–168, Plenum Press, New York.
48. Reddy, B. S. & Watanabe, K. (1979) *Cancer Res.* 39, 1521–1524.
49. Wilpart, M., Mainguet, P., Maskens, A. & Roberfroid, M. (1983) *Carcinogenesis* 4, 45–48.
50. Kelsey, M. I. & Pienta, R. J. (1979) *Cancer Lett.* 9, 143–149.
51. Liersch, M. & Stiehl, A. (1974) *Z. Gastroenterol.* 12, 131–134.
52. Cowen, A. E., Korman, M. G., Hofmann, A. F. & Cass, O. W. (1975) *Gastroenterology* 69, 59–66.
53. Chen, L. J., Bolt, R. J. & Admirand, W. H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 480, 219–227.
54. Hammermann, K. J., Chen, L. J., Corugedo, A. F. & Earnest, D. L. (1978) *Gastroenterology* 75, 1021–1025.
55. Marks, J. W., Sue, S. O., Pearlman, B. J., Bonorris, G. G., Varady, P., Lachin, J. M. & Schoenfield, L. J. (1981) *J. Clin. Invest.* 68, 1190–1196.

Dr. med. Norbert Breuer  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
Abteilung für Gastroenterologie  
Universitätsklinikum der Gesamthochschule Essen  
Hufelandstraße 55  
D-4300 Essen 1